

INTERNATIONALES BÜRO  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 7: <b>A61K 9/50</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/53163</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>14. September 2000 (14.09.00)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/01906</b> (22) Internationales Anmeldedatum: <b>3. März 2000 (03.03.00)</b> (30) Prioritätsdaten: <b>199 09 770.4 5. März 1999 (05.03.99) DE</b> (71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>LUBITZ, Werner (AT/AT); Schonborn gasse 12/7, A-1080 Wien (AT).</b> (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>HUTER, Veronika (AT/AT); Mariazellergasse 55, A-2544 Leobersdorf (AT).</b> (74) Anwälte: <b>WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</b></p>	<p>(81) Bestimmungstaaten: <b>AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), caraisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b></p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: <b>BACTERIAL GHOSTS AS CARRIER AND TARGETING VEHICLES</b> (54) Bezeichnung: <b>BAKTERIENGHOSTS ALS TRÄGER- UND TARGETINGVEHIKEL</b> (57) Abstract <b>The invention relates to bacterial ghosts as carrier and targeting vehicles for active ingredients.</b> (57) Zusammenfassung <b>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel für Wirkstoffe.</b></p>		

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Verinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige Jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	VU	Vanuatu
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel für eingekapselte Substanzen, z.B. Wirkstoffe.

Leere Bakterienhüllen, sogenannte Bakterienghosts, können durch kontrollierte, heterologe Expression eines Gens, das eine partielle Lyse der Zellmembran bewirkt, in gram-negativen Bakterien hergestellt werden (EP-A-0 291 021). Ein Beispiel für ein derartiges lytisches Gen ist das Gen E des Bakteriophagen PhiX174, das für ein Polypeptid kodiert, welches in den Zellwandkomplex gram-negativer Bakterien inseriert und durch die Oligomerisierung zur Ausbildung einer transmembranen Tunnelstruktur durch die innere und äußere Membran führt. Der innere Durchmesser dieser Tunnelstruktur kann je nach Lysebedingungen 40 bis 200 nm oder 500 bis 1000 nm betragen. Durch diesen Tunnel wird das cytoplasmatische Material der Zelle freigesetzt und eine leere Zellhülle mit intakter Morphologie zurückgelassen. Die Verwendung von Bakterienghosts als Totimpfstoffe oder Adjuvanzen sowie die Herstellung rekombinanter Bakterienghosts, die in ihrer Membran heterologe Oberflächenproteine tragen, wird in WO 91/13555 und WO 93/01791 beschrieben.

Weiterhin können Ghosts auch aus Gram-positiven Bakterien durch Verwendung eines chimären E-L-Lysegens hergestellt werden (US-A-5,075,223).

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Bakterienghosts hervorragend als Träger oder Targetingvehikel für Wirkstoffe geeignet sind. Ein erster Vorteil der Bakterienghosts besteht darin, daß die Applikation ohne weiteres über den natürlichen Infektionsweg von Pathogenen wie etwa über den

Respirations- oder den Gastrointestinaltrakt möglich ist. Darüber hinaus bietet das Applikationssystem von Wirkstoffen über Ghosts als Träger aufgrund der Spezifität der Bakterienghosts für verschiedene Gewebearten ein wirkungsvolles Targeting. Damit wird der Wirkstoff an den gewünschten Zielort, z.B. den entsprechenden potenziellen Infektionsort der Ausgangsbakterien, mit hoher Effizienz gebracht. Dieser Vorteil von natürlichen Hüllen pathogener Bakterien als Vektoren kann bei anderen Applikationsformen, wie z.B. Liposomen, mit eingebauten äußeren Membranproteinen nur mühsam und unzulänglich erreicht werden.

Da Bakterienghosts herstellbar sind, die ausschließlich den gewünschten Wirkstoff enthalten, kann ein hoher Beladungsgrad und somit eine hohe Effizienz des Wirkstoffs erreicht werden. Zudem stellen Ghosts ein sicheres Trägermaterial dar, da es sich nicht um lebensfähige Organismen handelt. Schließlich handelt es sich bei Ghosts um Produkte mit einer hohen immunstimulatorischen Wirkung aufgrund des Vorhandenseins von Lipopolysacchariden und Peptidoglykanen, so daß keine zusätzlichen Adjuvanzen zugegeben werden müssen, da die Ghosts den Adjuvanzeffekt per se erfüllen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Bakterienghosts zur Verpackung von Wirkstoffen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für einen Wirkstoff.

Der Wirkstoff kann jeder beliebige, in das Innere der Bakterienghosts transportierbare und dort vorzugsweise immobilisierbare Wirkstoff sein. Vorzugsweise wird der Wirkstoff ausgewählt aus pharmakologisch wirksamen Substanzen und Markierungssubstanzen. Beispiele für pharmakologisch wirksame Substanzen sind Polypeptide wie etwa Antikörper, therapeutisch wirksame Polypeptide wie Zytokine, Interferone,

Chemokine etc., Enzyme und immunogene Polypeptide oder Peptide. Ein weiteres Beispiel für Wirkstoffe sind Nukleinsäuren, insbesondere therapeutische Nukleinsäuren, z.B. Nukleinsäuren für die Gentherapie, die vorzugsweise in Form eines chromosomal integrierbaren Vektors vorliegen, oder Nukleinsäuren für eine Nukleinsäure-Vakzinierung, Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. Noch weitere Beispiele für Wirkstoffe sind niedermolekulare Wirksubstanzen, Peptide, Hormone, Antibiotika, Antitumormittel, Steroide, Immunmodulatoren etc. Die Wirkstoffe können in den Bakterienghosts in gelöster Form, als Suspensionen oder/und als Emulsionen gegebenenfalls in Kombination mit geeigneten Träger- oder/und Hilfsstoffen vorliegen. Weiterhin können die Wirkstoffe auch diagnostische Markierungssubstanzen, z.B. fluoreszierende Substanzen, Farbstoffe oder Röntgenkontrastmittel sein.

Auch nichtmedizinische Wirkstoffe können in Ghosts verpackt werden, z.B. Wirkstoffe aus dem Agrarbereich wie Insektizide, Herbizide, Mittel gegen Nematoden, Enzyme zur Bodenverbesserung, Dünger, Wachstumsförderer, wasserbindende Proteine zur besseren Durchfeuchtung oder Wasserbindung in der Atmosphäre. Andere Anwendungen sind die Verpackung von Farbstoffen für die Druckindustrie, z.B. fälschungssichere Tinten mit immunologischer Nachweismöglichkeit und die Verpackung von Vitaminen oder Probiotika für die Lebensmittelindustrie. Ebenso möglich ist die Verpackung von kosmetischen Mitteln oder von Stoffen wie Salzen oder anderen ionischen Substanzen.

Vorzugsweise liegt der Wirkstoff in den Bakterienghosts in immobilisierter Form vor, d.h. daß der verpackte Wirkstoff unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Zeitdauer innerhalb der Bakterienghosts verbleibt, um einen Transport zur Zielzelle bzw. zum Zielgewebe zu ermöglichen. Die Immobilisierung des Wirkstoffs kann mittels kovalenter oder nichtkovalenter Wechselwirkungen, z.B. elektrostatischer Wechselwirkungen, hochaffiner biologischer Wechselwirkungen, durch

mechanische Retention oder eine Kombination von zwei oder mehreren der genannten Möglichkeiten erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Immobilisierung des Wirkstoffs über direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit einem Rezeptor, der auf der Membranninnenseite, z.B. der Innenseite der Zytoplasmamembran, der Ghosts, als integraler Membranbestandteil oder als nichtintegraler Membranbestandteil auf der Membran verankert lokalisiert ist. Der Rezeptor kann beispielsweise ein heterologes Polypeptid sein, das über einen oder mehrere Membrananker in die zytoplasmatische Membran der Ghosts integriert ist und durch heterologe Expression entsprechender Fusionsproteine, die mindestens eine Membranankerdomäne sowie mindestens eine Rezeptordomäne enthalten, in den Bakterienzellen vor der Lyse zu den Ghosts erzeugt wird. Bevorzugte Beispiele für Rezeptordomänen sind Avidin oder Streptavidin, die zur Ausbildung hochaffiner Bindungen mit Biotin oder Biotinanaloga in der Lage sind. Besonders bevorzugt ist Streptavidin. Die Verankerung von Streptavidin in Bakterienghosts erfolgt vorzugsweise durch rekombinante Expression eines Streptavidin-Fusionsproteins mit einem C-terminalen Membrananker in der zytoplasmatischen Membran von Bakterien vor der zur Bildung von Ghosts führenden Lyse. Darüber hinaus sind auch andere Rezeptordomänen geeignet, z.B. Antikörperbindungsstellen, Lectine etc., die mit einem Bindepartner eine hochaffine Bindung eingehen können.

Alternativ ist eine Verankerung des Rezeptors auch erst nach Lyse der Ghosts an der Membranninnenseite möglich, beispielsweise durch Verwendung eines Rezeptors mit zwei Bindungsstellen, wobei eine Bindungsstelle in der Lage ist, an natürliche oder rekombinante Strukturen auf der Membranninnenseite mit hoher Affinität zu binden, und die zweite Bindungsstelle für die direkte oder indirekte Immobilisierung von Wirkstoffen zur Verfügung steht.

Ein auf der Membranninnenseite der Ghosts lokalisiertes Rezeptormolekül kann eine direkte oder indirekte Immobilisierung von Wirkstoffen im Inneren der Ghosts bewirken. Bei einer direkten Immobilisierung wird ein Rezeptor gewählt, der mit dem in die Ghosts zu verpackenden Wirkstoff eine ausreichend starke Wechselwirkung eingehen kann, um eine weitgehende oder vollständige Retention des Wirkstoffs im Ghostinneren zu bewirken. Hierzu kann man beispielsweise mit Biotin, Haptenen oder/und Zuckern modifizierte Wirkstoffe einsetzen, die mit Rezeptoren wie Streptavidin, Antikörpern oder Lectinen eine stabile Bindung eingehen können. Vorzugsweise verwendet man einen modifizierten Wirkstoff, der eine oder mehrere Biotingruppen trägt und mit hoher Affinität an einen Streptavidin-Rezeptor binden kann.

Alternativ kann auch eine indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor erfolgen, die z.B. über Wirkstoff-bindende Substanzen, die weiterhin mindestens eine zusätzliche Bindungsstelle für den Rezeptor besitzen, vermittelt wird. Beispiele für solche Wirkstoff-bindende Substanzen sind Polymere, z.B. Proteine wie Polylysin oder Polysaccharide wie etwa Protaminsulfat oder Dextran. Die Wirkstoff-bindenden Substanzen tragen weiterhin Rezeptorbindungsgruppen, z.B. Biotin oder Biotinanaloga, Haptene oder an Lectine bindefähige Zuckergruppen, die in der Lage sind, eine Verankerung an den auf der Membran lokalisierten Rezeptor zu bewirken.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen mit Wirkstoffen beladenen Ghosts gemäß dem zuvor genannten Aspekt der Erfindung umfaßt zunächst die Herstellung der Bakterienghosts nach bekannten Methoden, z.B. durch Transformation der Bakterienzelle mit einem Lysegen, vorzugsweise dem Gen E des Phagen PhiX174 oder dem chimären E-L-Gen. Die Expression des Lysegens in der Bakterienzelle erfolgt vorzugsweise durch eine regulierbare Expressionskontrollsequenz, z.B. durch das Temperatur-regulierbare Promotor/Repressor-System  $\lambda$ -pR/cl857. Bei diesem Expressionskontroll-

system werden die transformierten Bakterien bei Temperaturen unterhalb 30°C kultiviert. Durch Temperaturerhöhung, vorzugsweise auf  $\geq 40^\circ\text{C}$  wird der thermosensitive  $\lambda\text{cl857}$  Repressor inaktiviert und das Lysegen exprimiert, was zur Ausbildung einer transmembranen Tunnelstruktur in der Zellhülle führt, wobei die Zellen innerhalb von wenigen Minuten lysiert werden. Durch mutierte  $\lambda$ -Promotor/Operator-Systeme ist eine Anzucht der Bakterien auch bei höheren oder tieferen Temperaturen, z.B.  $37^\circ\text{C}$  möglich (WO98/07874). Die Bakterienghosts können dann durch Zentrifugation geerntet und nach Waschen und gegebenenfalls Gefriertrocknen zur Beladung mit Wirkstoffen eingesetzt werden. Hierzu werden die Ghosts mit einer den zu verpackenden Wirkstoff enthaltenden Lösung oder/und Suspension in Kontakt gebracht, unter Bedingungen, die das Eindringen ausreichender Wirkstoffmengen in die Bakterienghosts erlauben. Sofern erforderlich, werden darüber hinaus Rezeptorsubstanzen zugesetzt, die eine Immobilisierung der Wirkstoffmoleküle an der Membranninnenseite der Ghosts ermöglichen. Die Zugabe der Rezeptormoleküle kann vor, gleichzeitig oder nach dem Inkontaktbringen der Ghosts mit dem zu verpackenden Wirkstoff erfolgen.

Alternativ oder/und zusätzlich kann die Immobilisierung des Wirkstoffs über die Bildung einer Matrix im Ghostinneren erfolgen. Diese Matrix ist vorzugsweise eine Polymermatrix, die im Ghostinneren in situ entsteht und das Herausdiffundieren von Wirkstoffen aus den Ghosts verhindert. Die Polymermatrix kann durch Polymerisation oder/und Copolymerisation geeigneter Monomere oder/und durch Zusammenlagerung aggregierbarer Substanzen im Inneren der Bakterienghosts erzeugt werden. Die Polymerisation kann durch Einstellung entsprechender Bedingungen, z.B. durch Temperaturerhöhung, UV-Strahlung oder/und Zugabe geeigneter Initiatoren gestartet werden. Zweckmäßigerweise werden physiologisch verträgliche Monomere wie etwa Hydroxyfettsäuren, Aminosäuren, Saccharide oder Derivate davon verwendet, die zur Bildung eines im Körper unter physiologischen Bedingungen abbaubaren Polymeren führen.



Besonders bevorzugt wird die Matrix durch eine enzymkatalysierte Polymerbildung erzeugt. Hierzu werden geeignete Enzyme auf der Innenwand der Bakterienghosts immobilisiert, beispielsweise durch Integration in die Innenwand der zytoplasmatischen Membran (wie für Streptavidin beschrieben) oder indirekt, z.B. durch Bindung biotinylierter Enzyme an Streptavidinmoleküle auf der Ghostinnenmembran. Beispielsweise kann man zu diesem Zweck Enzyme verwenden, welche die Synthese von Polyhydroxyfettsäuren, z.B. Polyhydroxybuttersäure wie etwa die PHB-Synthase, Polysacchariden wie etwa Glucosyltransferasen oder Polypeptiden wie etwa nichtribosomale Polypeptid-synthetisierende Enzyme, die in der Peptidoglykansynthese vorkommen, katalysieren. Die durch Zugabe geeigneter Monomere und gegebenenfalls biochemischer Energieäquivalente wie etwa ATP in Gegenwart der Enzyme erfolgende Wirkstoffe führt dazu, daß die sich im Ghostinneren befindenden Wirkstoffe in der durch die Enzyme gebildeten Matrix eingesponnen und somit im Ghostinneren gehalten werden.

Alternativ kann die Matrix auch durch Zusammenlagerung von aggregierbaren Substanzen, z.B. von Molekülen oder kolloidalen Partikeln erfolgen. Diese Zusammenlagerung kann durch Änderung der Umgebungsbedingungen, z.B. Temperaturänderung oder/und pH-Änderung initiiert werden.

Bei derjenigen Ausführungsform der Erfindung, in der die Wirkstoffe durch Bindung einer Matrix im Ghostinneren immobilisiert werden, werden zunächst die zu verkapselnden Wirkstoffen in die Ghosts eingebracht und anschließend die Matrix gebildet.

Die erfindungsgemäßen Ghosts mit darin eingekapselten Wirkstoffen sind hervorragend als Träger- und Targetingvehikel geeignet, da die Ghosts schon aufgrund ihrer Natur als Bakterienhüllen bereits bevorzugt sich an bestimmte Zelltypen anlagern bzw. von Zellen des Immunsystems

aufgenommen werden. Verbessert werden kann dieses Targeting noch durch Verwendung von Ghosts mit modifizierten Hüllen, d.h. Ghosts, die targetspezifische, d.h. für Zielzellen oder Zielgewebe spezifische Oberflächenmoleküle an ihrer Membranaußenseite tragen. Die Einführung dieser targetspezifischen Moleküle wie etwa Zucker, z.B. Mannose oder Fucose, oder Invasin aus Yersinien oder Invasinderivaten, kann durch rekombinante Expression entsprechender Fusionspolypeptide in der Bakterienzelle vor der Lyse oder/und durch Anlagerung mittels eines geeigneten Rezeptorsystems (z.B. Streptavidin/Biotin) erfolgen.

Eine Ausführungsform der Erfindung ist der Einsatz der Wirkstoffe enthaltenden Ghosts für medizinische Zwecke. Die Verabreichung von Wirkstoffen, z.B. pharmakologischen Wirkstoffen, Antigenen, Antikörpern oder Nukleinsäuren, über Ghosts ist zur Prävention oder/und zur Bekämpfung aller Arten von Erkrankungen geeignet, z.B. zur Bekämpfung von durch Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen hervorgerufenen Erkrankungen, oder zur Prävention oder/und zur Bekämpfung von Tumor- oder Autoimmunerkrankungen oder zur Gentherapie. Als Wirkstoff wird dabei eine gegen die jeweilige Erkrankung wirksame Substanz verwendet, die nach Transport und gegebenenfalls Internalisierung in der Zielzelle ihre physiologische Wirkung hervorrufen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht auch die Verabreichung von Wirkstoffkombinationen, d.h. die Ghosts können mehrere verschiedene Wirkstoffe enthalten oder es können Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Wirkstoffen verwendet werden. Weiterhin kann die Verabreichung von Wirkstoffen über Ghosts auch für diagnostische Zwecke (Imaging) eingesetzt werden.

Eine besonders bevorzugte Anwendung ist der Einsatz von Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel für die Gentherapie. Durch Verpackung von Nukleinsäuren wie DNA oder RNA in Ghosts kann die mangelnde Spezifität bestehender Nukleinsäure-Vehikel wie z.B. Liposomen entscheidend

verbessert werden. Der Vorteil von Bakterienghosts als Trägervehikel besteht weiterhin darin, daß sie eine hohe Kapazität für die Beladung mit Nukleinsäuren besitzen. Sie sind zudem als Vektoren ungefährlich, da sie keine lebenden Zellhüllen darstellen. Für gentherapeutische Anwendungen können die Nukleinsäuren in den Ghosts beispielsweise mit Polyhydroxyalkanoaten, z.B. Polyhydroxybuttersäure oder Copolymeren von Hydroxybuttersäure mit anderen Hydroxyfettsäuren wie etwa 3-Hydroxytridecansäure komplexiert werden. Dabei können die Nukleinsäuren in einer wachsenden Polymermatrix immobilisiert werden oder Komplexe aus Nukleinsäuren und amorphen Polyhydroxyfettsäuregranula hergestellt werden. Noch eine weitere Möglichkeit zur Verkapselung von Nukleinsäure in Bakterienghosts besteht darin, DNA-bindende Proteine wie etwa Polylysin oder Protamine, bei denen es sich um globuläre, stark alkalische Proteine mit relativ geringem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 handelt, zu verwenden. Protamine können aus entfetteten Vogel- oder Fichspermien durch Schütteln mit verdünnten Säuren in Form von kristallinen Salzen, z.B. Protaminsulfate gewonnen werden. Protamine können in Ghosts in Form von Fusionsproteinen in die Membran eingelagert werden oder alternativ durch Biotinylierung an membrangebundenes Streptavidin in den Ghosts verankert werden.

Noch eine besonders bevorzugte Anwendung ist der Einsatz von Bakterienghosts zur Herstellung einer Nukleinsäure-Vakzine, insbesondere zur Herstellung einer DNA-Vakzine, und der Einsatz von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für eine Nukleinsäure-Vakzine, insbesondere für eine DNA-Vakzine.

Bakterienghosts als Träger- oder Targetingvehikel zur Nukleinsäure-Vakzinierung führen zur Bildung einer wirkungsvollen und langandauernden spezifischen Immunantwort. Die die Nukleinsäuren enthaltenden Bakterienghosts werden von primären Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie etwa dendritischen Zellen und Makrophagen durch spezifische

Rezeptoren aufgenommen und in antigene Peptide fragmentiert. Zusätzlich wird mit hoher Effizienz das Antigen, welches durch die verpackte DNA-Sequenz kodiert wird, in den APC exprimiert. Dies hat zur Folge, daß das Antigen auf der Oberfläche der APC im Kontext mit MHC-I oder/und MHC-II Strukturen den T-Lymphozyten präsentiert wird und eine Immunantwort induzieren kann. Untersuchungen ergaben in diesem Zusammenhang, daß Antigenprozessierungen und Präsentation durch MHC-I und II-Komplexe erfolgen, wobei eine humorale und zelluläre Immunantwort induziert wird, wie sie auch bei bakteriellen Infektionen mit Lebendkeimen beobachtet wird.

Die in die Bakterienghosts verpackte Nukleinsäure ist vorzugsweise in einer im Empfängerorganismus nicht replizierbaren Form. Sie enthält eine Sequenz, die für das in der Zielzelle zu exprimierende Antigen kodiert, in expressionsfähiger Form, d.h. in operativer Verknüpfung mit in der Zielzelle aktiven Expressionskontrollsequenzen wie etwa Promotoren und gegebenenfalls Enhancern, um eine hohe Genexpression zu erlauben, Polyadenylierungssequenzen, um eine korrekte Termination der transkribierten mRNA zu gewährleisten, oder/und Translationsinitiations-Sequenzen, um eine hohe Proteinproduktion zu ermöglichen. Weiterhin können die Nukleinsäuren einen bakteriellen Replikationsursprung, welcher die Amplifikation großer Nukleinsäuremengen in Bakterien wie etwa E.coli erlaubt, ein prokaryontisches Selektionsmarkergen, z.B. für eine Antibiotikaresistenz, ein Reportergen, das eine einfache Bestimmung der Expressionshöhe ermöglicht, z.B. das GFP-Gen oder/und immunmodulatorische Sequenzen enthalten.

Vorzugsweise ist die Nukleinsäure eine DNA, besonders bevorzugt eine Plasmid-DNA, die in zirkulärer oder/und in linearer Form vorliegen kann. Es ist jedoch auch die Verwendung von RNA-Vakzinen oder Vakzinen auf Basis von Nukleinsäureanaloga, die transkribierbar sind, aber eine erhöhte physiologische Stabilität aufweisen, denkbar.

Der die Expression der Antigen-kodierenden Sequenz antreibende Promotor ist vorzugsweise ein starker viraler Promotor/Enhancer, z.B. der Rous Sarcoma Virus (RSV)-Promotor/Enhancer, der Murine Leukemia Virus (MLV)-Promotor/Enhancer, der SV40-Promotor/Enhancer und besonders bevorzugt der Cytomegalovirus (CMV)-Promotor/Enhancer. Als Transkriptions-terminatoren können die Polyadenylierungssequenzen aus SV40 oder aus dem Rinderwachstumshormongen, vorzugsweise jedoch aus dem Kaninchen- $\beta$ -Globin-Gen verwendet werden.

10 Als Antigen wird dabei ein mit der jeweiligen Erkrankung assoziiertes Polypeptid oder ein Peptidfragment davon verwendet, das nach Expression in der Zielzelle eine Immunantwort induziert. Die vorliegende Erfindung ermöglicht auch die Verabreichung von Kombinationsvakzinen, d.h. die Ghosts können mehrere verschiedene Antigen-kodierende Nukleinsäuren  
15 enthalten, die z.B. vom selben Erreger oder von unterschiedlichen Erregern stammen können, oder es können Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung können sogenannte homologe  
20 Kombinationen von Bakterienghost und Antigen-kodierender Nukleinsäure verwendet werden, wobei z.B. der Bakterienghost Oberflächenstrukturen trägt, die aus der gleichen Spezies oder dem gleichen Organismus stammen wie das von der Nukleinsäure-Vakzine kodierte Antigen. Gegebenenfalls kann der Ghost auf seiner Oberfläche sogar eine dem kodierten Antigen  
25 entsprechende Oberflächenstruktur tragen. Diese homologe Ghost/Nukleinsäure-Kombination kommt insbesondere zur Vakzinierung gegen bakterielle Infektionen in Frage, sie kann jedoch - bei Verwendung von rekombinanten Ghosts mit entsprechenden Oberflächenstrukturen - auch auf die Vakzinierung gegen andere Erkrankungen, z.B. virale  
30 Erkrankungen, erweitert werden.

Alternativ dazu wird eine heterologe Ghost/Nukleinsäure-Kombination verwendet. Bei einer derartigen heterologen Kombination erfüllt der Bakterienghost im allgemeinen Adjuvansfunktionen. Es sind jedoch auch Ausführungsformen möglich, bei denen ein aus einem pathogenen Bakterium stammender Ghost in Kombination mit einer heterologen Nukleinsäure als Kombinationsvakzine gegen zwei unterschiedliche Erreger verwendet wird.

Schließlich sind die Bakterienghosts auch als Träger- oder Targetingvehikel für den Agrarbereich geeignet, wo sie zum Ausbringen von Wirkstoffen wie etwa Herbiziden, Fungiziden oder/und Insektiziden verwendet werden können.

Besonders bevorzugt stammen die Ghosts von gram-negativen Bakterien, die z.B. ausgewählt werden aus *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Bordetella*, *Helicobacter*, *Francisella*, *Branhamella*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Rhizomonas* und *Sphingomonas*. Besonders bevorzugte Beispiele für gram-positive Bakterien sind *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Bacillus*.

Die pharmazeutische Verabreichung der Wirkstoff-enthaltenden Ghosts kann nach geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise oral, aerogen, z.B. intranasal, intraokulär, topisch oder parenteral, z.B. intramuskulär, intraperitoneal, intravenös oder subkutan.

Die Verabreichung der Ghosts erfolgt vorzugsweise auf demselben Weg, wie auch eine natürliche Infektion des Organismus mit dem Erreger erfolgt. So können Bakterienghosts mit Wirkstoffen, die zur Bekämpfung von pathogenen Erregern vorgesehen sind, deren Haupteintrittspforte der Gastrointestinaltrakt ist (*E.coli*, *Salmonella*, *Vibrio* oder *Helicobacter*), oral

verabreicht werden. Ghosts aus Erregern von Lungenentzündungen, die entsprechende Wirkstoffe enthalten, z.B. Actinobacillus, Pasteurella, Pseudomonas oder Haemophilus, werden vorzugsweise aerogen verabreicht.

5 Die erfindungsgemäße Verabreichung von Bakterienghosts mit Wirkstoffen ist nicht nur für die Humanmedizin, sondern auch für die Tiermedizin, insbesondere für die protektive Impfung von Haustieren, wie etwa Schweinen, Kühen etc. geeignet.

10 Für landwirtschaftliche Anwendungsformen können die Ghosts über den Boden, die Luft oder als Kapseln an Samen verabreicht werden.

Die Applikation von Wirkstoffen über Bakterienghosts hat gegenüber bisherigen Applikationsformen eine Vielzahl von Vorteilen. So reichen  
15 bereits geringe Wirkstoffmengen zur Erzielung einer starken Wirkung aus. Weiterhin ist eine Zielzellen/Gewebe-spezifische Verabreichung der Wirkstoffe möglich. Aufgrund der bereits für sich immunogen wirkenden Bakterienghosthüllen wird eine Adjuvanswirkung erzielt. Der in den Ghost eingeschlossene Wirkstoff ist vor Abbau durch physiologische Prozesse,  
20 z.B. durch Enzyme wie Proteasen, Nukleasen oder Hydrolasen geschützt. Darüber hinaus ist eine Kombination mit weiteren Wirkstoffen möglich. Schließlich können die Bakterienghosts kostengünstig hergestellt und die Wirkstoffe einfach und kostengünstig formuliert werden.

25 Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Bakterienghosts mit einem darin verkapselten Wirkstoff, wobei es sich bei dem Wirkstoff beispielsweise um eine Nukleinsäure handeln kann.

Schließlich betrifft die Erfindung auch eine pharmazeutische oder  
30 landwirtschaftliche Zusammensetzung, umfassend einen Bakterienghost mit einem darin verpackten Wirkstoff. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann in Form üblicher pharmazeutischer Präparate

vorliegen, z.B. als injizierbare oder aerogen applizierbare Lösung oder Suspension, als orales Präparat, z.B. als Tablette, Kapsel oder Dragee, als Creme oder Salbe etc. Weiterhin kann die Zusammensetzung als rekonstituierbares Lyophilisat vorliegen.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist erhältlich durch ein Verfahren umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen von Bakterienghosts und
- (b) Inkontaktbringen der Bakterienghosts mit einem Wirkstoff unter Bedingungen, die zu einer Verpackung und vorzugsweise zu einer Immobilisierung des Wirkstoffs in den Ghosts führen.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele erläutert. Es zeigen:

Figur 1 eine schematische Darstellung des Streptavidin-Verankerungsplasmids pAV1, das ein Fusionsgen E'-FXa-StrpA unter Kontrolle des induzierbaren lac-Promotors (lacPO), den Replikationsursprung ColE1 und das Ampicillinresistenzgen bla enthält.

Figur 2 die Reaktionskinetik von in Streptavidin-Ghosts gebundener Alkalischer Phosphatase.

## Beispiele

### 1. Material und Methoden

#### 1.1 Herstellung von Streptavidin-kodierenden Plasmiden

Das Plasmid pBGG9 (British Biotechnology Limited) wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII geschnitten. Ein das vollständige Streptavidingen (Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 1871-1882)



enthaltendes 495 bp DNA-Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Elektroelution isoliert. Die NdeI-Restriktionsstelle wurde mit Klenow Polymerase aufgefüllt, und das Fragment wurde zwischen die HincII- und HindIII Restriktionsstellen von M13K11RX (Waye et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 8561-8571) inseriert. Das resultierende Phageimid M13FN enthält 160 Kodons des Streptavidingens fusioniert an das 3'-Ende einer kurzen Sequenz, welche für die Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg des Proteasefaktors Xa (FXa) kodiert. Diese FXa-StrpA Kasette wurde durch Restriktionsspaltung mit BamHI isoliert, und das resultierende 509 bp lange DNA-Fragment wurde in das mit BamHI linearisierten Plasmid pSK- (Stratagene, Cleveland, Ohio) subkloniert, um das Plasmid pFN6 zu erzeugen. Dasselbe 509 bp lange BamHI-Fragment wurde in den mit BamHI gespaltenen Membrantargetingvektor pKSEL5 inseriert, wobei das Plasmid pAV11 mit dem Streptavidingen fusioniert an die 5'-terminale Membranankersequenz E' erhalten wurde (Fig. 1).

### 1.2 Herstellung von Streptavidinhosts

E.coli NM522-Zellen (Stratagene) wurden simultan mit dem Lyseplasmid pML1 (Szostak et al., J. Biotechnol. 44 (1996), 161-170) und dem Streptavidin-kodierenden Plasmid pAV1 transformiert. Die Transformanten wurden in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit Ampicillin (200 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) bei 28°C kultiviert. 1 l Medium wurde mit einer Übernachtskultur inokuliert, die aus einer einzelnen Transformantenkolonie stammte, und als Vorkultur für einen Fermenter (Typ MRD 60TE, Meredos GmbH, Bovenden, Deutschland) verwendet. Die Bakterien wurden im Fermenter in einem Volumen von 10 l unter Belüftung und Rühren bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,4 kultiviert. Dann wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 3 mM zur Induktion der Expression von Streptavidin zugegeben. Nach 30 min wurden

0,2 M  $\text{MgSO}_4$  zugegeben und 20 min danach wurde die Expression des Lyseproteins E durch Temperaturerhöhung von  $28^\circ\text{C}$  auf  $42^\circ\text{C}$  induziert. Nach 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g geerntet. Die Resuspension der Pellets in destilliertem Wasser (Endvolumen 5 l) führte zu einer sofortigen Lyse. Die Ghosts wurden zweimal in einem großen Volumen von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und anschließend lyophilisiert.

### 1.3 Licht- und Elektronenmikroskopie

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Olympus AX70 TrueResearch System Microscope durchgeführt. Transmissions-Elektronenmikrographien wurden mit einem Siemens Elmiskop 101 Elektronenmikroskop aufgenommen. Raster-Elektronenmikrographien wurden mit einem Hitachi S-800 Feldemissions-Raster-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Fixierung von Zellen und die Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie erfolgte wie bei Witte et al. (J. Bacteriol. 172 (1990), 4109-4114) beschrieben.

Zum Nachweis von Streptavidin wurden die Ghosts mit goldmarkiertem Albumin-Biotin (10 nm, Sigma Immunochemicals) verdünnt in Tris-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4) unter Schütteln bei  $37^\circ\text{C}$  für 20 min inkubiert, gewaschen und für die Elektronenmikroskopie fixiert.

### 1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Ghosts oder Proteinproben wurden in einem Gelbeladepuffer (2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin und 0,003% Bromphenolblau in 0,063 M Tris-HCl Puffer pH 6,8) für 5 min aufgekocht und auf 10% SDS Polyacrylamidgel nach der Methode von Laemmli (Nature 227 (1970), 680 bis 685) aufgetrennt. Westernblots wurden wie von Towbin et al. (Biotechnology 24 (1992), 145-149) beschrieben durchgeführt. Die Blots

wurden in TBS mit 1% Rinderserum blockiert und mit Anti-Streptavidin-Antiserum aus Kaninchen (Sigma Immunochemicals) inkubiert.

### 1.5 Bindung von biotinylierter Alkalischer Phosphatase und Fluoreszenz-markiertem Biotin

Biotinylierte Alkalische Phosphatase (Pierce) wurde 1:1000 in Tris-Puffer verdünnt. 2 mg lyophilisierte Ghosts wurden in 500  $\mu$ l verdünnter Lösung von Alkalischer Phosphatase suspendiert und unter Schütteln bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und dreimal in 20 ml Trispuffer und ein viertes Mal in Diethanolaminpuffer (10 mM Diethanolamin, 0,5 mM  $MgCl_2$  pH 9,5) gewaschen und anschließend in 6 Aliquots unterteilt. Dann wurde Substrat (2,5 mM p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer) zugegeben und die Reaktionen nach 0,5, 1, 2, 4, 8 oder 16 min durch Zugabe eines gleichen Volumens an 7 M NaOH gestoppt. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und die Überstände bei 410 nm vermessen.

Es wurde ein molarer Adsorptionskoeffizient  $\epsilon = 18,5 \times 10^3 \text{ x M}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$  bestimmt und zur Berechnung der gebildeten Menge an p-Nitrophenol nach der Lambert-Beer Gleichung verwendet. Die Anzahl der pro Ghost gebundenen Moleküle Alkalischer Phosphatase wurde unter der Annahme berechnet, daß eine Aktivitätseinheit der Alkalischen Phosphatase der Freisetzung von 1  $\mu$ mol Nitrophenol pro min bei pH 9,5 und 37°C entspricht. Eine Einheit Alkalische Phosphatase entspricht 0,7  $\mu$ g; das Molekulargewicht ist 140 000 und 1 mg Ghost enthalten  $6,7 \times 10^8$  einzelne Hüllen.

Zur Bindung von Fluoreszenz-markiertem Biotin (FITC-Biotin) wurden die Ghosts wiederholt in PBS gewaschen, bis die relative Fluoreszenzintensität im Überstand geringer als 0,5 bei 530 nm (Anregung bei 490 nm) war. 1 mg lyophilisierte Ghosts wurden in 2 ml einer Lösung mit 0,4056  $\mu$ g FITC-

Biotin/100 ml TBS unter Schütteln für 30 min inkubiert. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und die Fluoreszenzintensität in den Überständen gemessen.

#### 5 1.6 Biotinylierung von Polylysin

Poly-L-Lysin-Hydrobromid, Molekulargewicht 18 000 (Sigma) wurde unter Verwendung des folgenden Protokolls biotinyliert: 6 mg Polylysin wurden in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgenommen. 50 µl einer 10 Lösung von 640 µg Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim) in 200 µl DMSO wurden zugegeben und der pH-Wert unter Verwendung von 0,5 M NaOH auf 10 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 48 h gegen Wasser 15 dialysiert. Ein HABA-Test (Sigma) ergab ein Bindeverhältnis von 2 mol Biotin pro mol Polylysin.

#### 20 1.7 Fluoreszenzmarkierung von DNA

Ein beliebiges ausgewähltes Plasmid (pUC18) wurde zur Erzeugung von fluoreszenzmarkierter DNA verwendet. Die Markierung erfolgte unter Verwendung der Polymerase Kettenreaktion und markierter Nukleotide (Cy3-dCTP, Pierce). Die Reaktionsansätze enthielten 200 µM dATP, 200 µM 25 dGTP, 200 µM dTTP, 200 µM dCTP (davon 75% Cy3-dCTP), jeweils 1 µM Oligonukleotidprimer, 0,2 ng/µl linearisierte Plasmid DNA und 0,02 U/µl Taq DNA Polymerase in Polymerasepuffer. Das Reaktionsprotokoll war wie folgt: Vordenaturierung 4 min bei 95°C; 35 Cyclen: 1 min 95°C/1 min 60°C/3 min 72°C; 5 min Schlußextension bei 72°C. Die Proben wurden 30 phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert, in 10 mM Tris HCl pH 8,0 resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 1.8 Bindung von fluoreszenzmarkiertem Dextran und DNA/Polylysin

1 mg lyophilisierte Streptavidin-Ghosts wurden in 1 ml Tris Puffer suspendiert. 50  $\mu$ l einer wässrigen Lösung (1 mg/ml) von biotinyliertem Fluoreszenz-markiertem Dextran (Molecular Probes Europe BV) wurden zugegeben und die Mischung unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Ghosts wurden dreimal in 1,5 ml Tris-Puffer gewaschen und durch Lichtmikroskopie analysiert. Zur Bildung von Komplexen aus fluoreszenzmarkierter DNA und biotinyliertem Polylysin wurden verdünnte Lösungen von DNA (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l in HBS [150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,3-]) und Poly-L-Lysin (1  $\mu$ g/ $\mu$ l in HBS) hergestellt. Die Lösungen wurden in einem Gewichtsverhältnis DNA/Polylysin von 10:1 vereinigt und schnell vermischt. Dann wurden Streptavidin-Ghosts darin suspendiert, unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert, gewaschen und lichtmikroskopisch analysiert.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Membranverankerung von Streptavidin

Bei Verwendung von Bakterienghosts als Vehikel zum Transport von Wirkstoffen sollte der Wirkstoff innerhalb der Bakterienhülle fixiert werden. Rekombinante Ghosts, die Streptavidin verankert in ihrer Hülle enthalten, sind in der Lage biotinylierte Verbindungen mit hoher Affinität zu binden. Hierzu wurde - wie unter 1.1 beschrieben - das Plasmid pAV1 hergestellt, welches ein Hybridgen enthält, das aus den 54 5'-terminalen Kodons des Gens E des Bakteriophagen PhiX174 (E') gefolgt von einer in frame-Fusion der FXa-StrpA-Kassette besteht. Dieses Plasmid ist schematisch in Fig. 1 dargestellt.

## 2.2 Herstellung von Streptavidin-Ghosts

Es stehen mehrere E-spezifische Lyseplasmide mit verschiedenen Gen E Expressionskontrollsequenzen, Replikationsursprüngen und Selektionsmarkergenen zur Verfügung (Szostak et al., J. Biotechnol. 44 (1996), 161-170). Das hier verwendete Plasmid pML1 enthält das Gen E unter transkriptioneller Kontrolle des  $\lambda p_{R-cl857}$  Systems. Der Beginn der Lyse kann im E.coli Stamm NM522/pML1 durch Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm etwa 10 min nach Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C beobachtet werden.

Zur Herstellung von Ghosts durch ein alternatives E-Lyseprotokoll wurden 0,2 M  $MgSO_4$  zum Kulturmedium 20 min vor der Induktion der Gen E Expression gegeben. Bei dieser Prozedur wird das Protein E in den bakteriellen Zellwallkomplex eingebaut, aber die Zell-Lyse wird durch die hohe Salzkonzentration im umgebenden Medium gehemmt. In mit  $MgSO_4$  behandelten Kulturen wird die Expression des Gens E für 1 h durchgeführt und die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Eine Resuspension dieser Zellen in Wasser oder Puffer mit geringer Ionenstärke führt zu einer sofortigen, explosiven Lyse, die erheblich größere Lyselöcher als die normale E Lyse erzeugt.

## 2.3 Mikroskopische Darstellung von durch alternative Lyse erzeugten Ghosts

Ghosts sind von lebenden Zellen durch lichtmikroskopische Untersuchungen unterscheidbar, bei denen sie deutlich transparenter als intakte Bakterien erscheinen. Lichtmikroskopische Untersuchungen an Ghosts, die durch alternative E-Lyse erzeugt worden waren, zeigten Zellen mit abgesprengten Polkappen oder Rissen in der Mitte, die sie in zwei Hälften öffnen. Die Ghosts erschienen etwas verlängert.

#### 2.4 Nachweis von Streptavidin mit Gold-konjugiertem Biotin

Zum Nachweis der Lokalisierung von Streptavidin in den Ghosts, wurden Streptavidin-Ghosts mit goldmarkierten Albumin-Biotinpartikeln inkubiert, gewaschen und elektronenmikroskopisch untersucht. Ultradünnschnitte zeigten Goldpartikel, die ausschließlich entlang der Ghost-Innenmembran angeordnet waren.

#### 2.5 Bestimmung der Streptavidinverankerung in Ghosts

Zur Bestimmung ihres Streptavidingehalts wurden Streptavidin-Ghosts zusammen mit definierten Mengen an reinem Streptavidin als Kontrolle durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die Gele wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Anti-Streptavidin-Antiserum behandelt. Eine densitometrische Analyse der Streptavidin-spezifischen Banden auf Westernblots zeigte einen Streptavidingehalt von etwa 5% des gesamten Zellgewichts.

#### 2.6 Funktionelle Bindung von biotinylierter alkalischer Phosphatase und FITC Biotin und Quantifizierung der Bindestellen

Zur Bestimmung der Biotinbindekapazität von Streptavidin-Ghosts wurde ein enzymatischer Test entwickelt. Streptavidin-Ghosts und Streptavidin-negative Ghosts (Ghosts ohne auf ihrer Membran verankertes Streptavidin), die beide durch das alternative Lyseprotokoll hergestellt worden waren, und Streptavidin-Ghosts, die durch Standardlyse hergestellt worden waren, wurden mit biotinylierter Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde die Menge an zurückgehaltenem Enzym unter Verwendung von p-Nitrophenylnitrophosphat als Substrat bestimmt. Während in Streptavidin-negativen Ghostproben praktisch keine Reaktion sichtbar war, zeigten alternativ lysierte Streptavidinghosts eine hellgelbe

Färbung. Die Reaktion wurde nach kontrollierten Intervallen gestoppt und die Absorption der Probenüberstände bei 410 nm gemessen.

Nach der unter 1.5 angegebenen Berechnungsmethode wurde die Anzahl der pro Ghost gebundenen Moleküle Alkalischer Phosphatase mit etwa 200 bestimmt. Interessanterweise waren die durch normale Lyse erzeugten Streptavidin-Ghosts negativ im enzymatischen Test. Folglich ist bei großen Wirkstoffmolekülen wie der Alkalischen Phosphatase das Vorhandensein von durch das alternative Lyseprotokoll erzeugten größeren Löchern in der Zellmembran erforderlich, um eine effiziente Diffusion in das Innere des Ghosts zu ermöglichen.

Fig. 2 zeigt die Kinetik der Reaktion von biotinylierter Alkalischer Phosphatase, die an durch alternative Lyse erzeugten Streptavidin-Ghosts gebunden wurde. Als Kontrolle wurden Streptavidin negative Ghosts erzeugt durch alternative Lyse verwendet.

Ein entsprechender Test wurde unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Biotin durchgeführt. Ghost- und Streptavidin-Ghost-Proben wurden mit FITC-Biotin inkubiert, zentrifugiert und die restliche Fluoreszenz von ungebundener Markierung in den Überständen gemessen. Diese viel kleineren Moleküle (Molekulargewicht 832) wurden in einer Anzahl von  $2060 \pm 400$  pro Ghost gebunden.

## 2.7 Bindung von fluoreszenzmarkiertem biotinyliertem Dextran und fluoreszenzmarkierter DNA

Fluoreszenzmarkiertes biotinyliertes Dextran und fluoreszenzmarkierte DNA wurden als Modell verwendet, um die Fixierung von Verbindungen zu zeigen, die zum Targeting von Wirkstoffen in Streptavidin-Ghosts verwendet werden können. Hierzu wurden Streptavidin-Ghosts mit einer Mischung von biotinyliertem Poly-L-Lysin und fluoreszenzmarkierter DNA bzw. mit



- 23 -

fluoreszenzmarkiertem biotinyliertem Dextran inkubiert und durch Fluoreszenzlichtmikroskopie analysiert. In beiden Fällen konnte die Fluoreszenzmarkierung auf den Ghosts nachgewiesen werden. Negative Kontrollen (Ghosts ohne Streptavidin) wurden nicht angefärbt.

### Ansprüche

1. Verwendung von Bakterienghosts zur Verpackung von Wirkstoffen.
2. Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für einen Wirkstoff.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff ausgewählt ist aus pharmakologisch wirksamen Substanzen, Markierungssubstanzen, landwirtschaftlich wirksamen Substanzen und Farbstoffen.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff in den Bakterienghosts in immobilisierter Form vorliegt.
5. Verwendung nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Immobilisierung über Wechselwirkungen mit einem Rezeptor erfolgt, der auf der Membrannenseite der Ghosts lokalisiert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Rezeptor ein heterologes Polypeptid ist, das in die zytoplasmatische Membran der Ghosts integriert ist.

- 25 -

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das heterologe Polypeptid ein Streptavidin oder Avidin  
enthaltendes Fusionspolypeptid ist.

5

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine direkte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
erfolgt.

10

9. Verwendung nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen mit Rezeptorbindungsgruppen derivatisierten Wirkstoff  
verwendet.

15

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
erfolgt.

20

11. Verwendung nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
über Wirkstoff-bindende Substanzen erfolgt, die weiterhin mindestens  
eine zusätzliche Bindungsstelle für den Rezeptor besitzen.

25

12. Verwendung nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Wirkstoff-bindenden Substanzen ausgewählt werden aus  
Polylysin, Dextran und Protaminsulfat.

30

13. Verwendung nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Immobilisierung über die Bildung einer Matrix im  
Ghostinneren erfolgt.
- 5
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Matrix durch Polymerisation oder/und Copolymerisation von  
Monomeren im Ghostinneren entsteht.
- 10
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Polymerisation durch Temperaturerhöhung, durch UV-  
Strahlung oder/und Zugabe von Initiatoren gestartet wird.
- 15
16. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß eine enzymkatalysierte Polymerisation erfolgt.
- 20
17. Verwendung nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Enzyme eingesetzt werden, die die Synthese von  
Polyhydroxyfettsäuren, Polysacchariden oder Polypeptiden  
katalysieren.
- 25
18. Verwendung nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Matrix durch Zusammenlagerung von aggregierbaren  
Substanzen gebildet wird.
- 30

- 27 -

19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ghosts heterologe, für Zielzellen oder Zielgewebe spezifische Oberflächenmoleküle enthalten.
- 5
20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche im medizinischen Bereich.
- 10
21. Verwendung nach Anspruch 20 zur Prävention oder/und zur Bekämpfung von durch Pathogene hervorgerufenen Erkrankungen, von Tumorerkrankungen oder von Autoimmunerkrankungen.
22. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21 zur Gentherapie.
- 15
23. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21 zur Nukleinsäure-Vakzinierung.
24. Verwendung nach Anspruch 20 für diagnostische Zwecke.
- 20
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung der Ghosts auf demselben Weg wie die natürliche Infektion des Organismus mit dem Erreger erfolgt.
- 25
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 19 im Agrarbereich.
27. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ghosts mehrere verschiedene Wirkstoffe enthalten.
- 30

- 28 -

28. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Wirkstoffen eingesetzt werden.
- 5
29. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ghosts von gram-negativen oder/und gram-positiven Bakterien stammen.
- 10
30. Verwendung von Bakterienghosts zur Herstellung einer Nukleinsäure-Vakzine.
- 15
31. Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für eine Nukleinsäure-Vakzine.
- 20
32. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die in den Ghosts verpackte Nukleinsäure eine für das zu exprimierende Antigen kodierende Sequenz in operativer Verknüpfung mit Expressionskontrollsequenzen enthält.
- 25
33. Verwendung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure weiterhin einen bakteriellen Replikationsursprung, ein prokaryontisches Selektionsmarkergen, ein Reportergen oder/und immunmodulatorische Sequenzen enthält.
- 30
34. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Ghosts mehrere verschiedene Antigen-kodierende Nukleinsäuren enthalten.

- 29 -

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 34,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine homologe Kombination von Bakterienghosts und  
Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 34,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine heterologe Kombination von Bakterienghosts und  
Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet.
37. Bakterienghost mit einem darin verkapselten Wirkstoff.
38. Bakterienghost nach Anspruch 37,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff eine Nukleinsäure ist.
39. Pharmazeutische oder landwirtschaftliche Zusammensetzung,  
umfassend einen Bakterienghost mit einem darin verpackten  
Wirkstoff.
40. Verfahren zur Herstellung eines Bakterienghosts nach Anspruch 37  
oder 38 oder einer Zusammensetzung nach Anspruch 39, umfassend  
die Schritte
- (a) Bereitstellen von Bakterienghosts und
  - (b) Inkontaktbringen der Bakterienghosts mit einem Wirkstoff  
unter Bedingungen, die zu einer Verpackung des Wirkstoffs in  
den Ghosts führen.

- 30 -

### Zusammenfassung

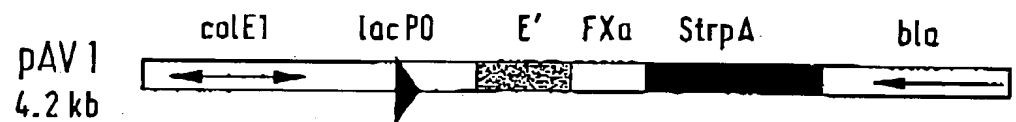
Die Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- und  
s Targetingvehikel für Wirkstoffe.

10 vo 4. März 1999



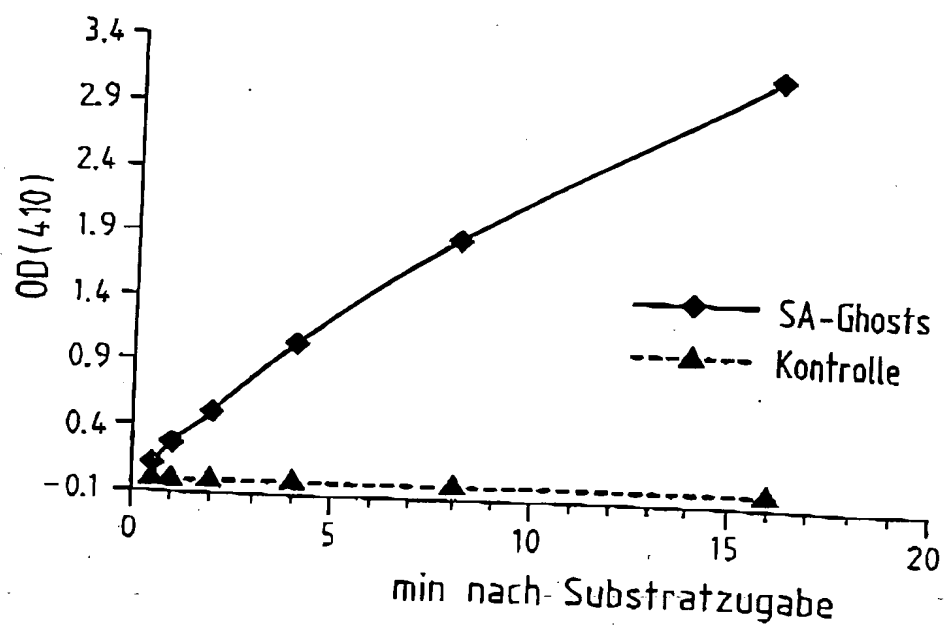
1/2

Fig. 1



2 / 2

Fig. 2



## INT NATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nation. Aktenzeichen

PCT/EP 00/01906

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfung (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 39 19 644 A (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 20. Dezember 1990 (1990-12-20)  Ansprüche 1,4,14,24,33	1-3, 19-21, 25,27, 29,39,40
A	DE 25 41 685 A (TÖPFER GMBH) 24. März 1977 (1977-03-24) das ganze Dokument	1-3
A	EP 0 242 135 A (AD2 LIMITED) 21. Oktober 1987 (1987-10-21) Ansprüche 1,7	1-3,26, 37,39,40

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den eigentlichen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeter Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*-\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeter Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*A\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Juli 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

17/07/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patendaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Benz, K

Formblatt PCT/ISA/210 (Seite 2) (Juli 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01906

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	M.P. SZOSTAK ET AL.: "Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 44, Nr. 1, 26. Januar 1996 (1996-01-26), Seiten 161-170, XP004036862 Amsterdam (NL) Seite 169, Absatz 2.6	1-3, 19-21, 29,37, 39,40
P,X	W. LUBITZ ET AL.: "Extended recombinant bacterial ghost system" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 73, Nr. 2-3, 20. August 1999 (1999-08-20), Seiten 261-273, XP002138570 Amsterdam (NL) Seite 271, Absatz 10 -Seite 272	1-40
P,X	V. HUTER ET AL.: "bacterial ghosts as drug carrier and targeting vehicles" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, Bd. 61, Nr. 1-2, 27. August 1999 (1999-08-27), Seiten 51-63, XP000907214 Amsterdam (NL) das ganze Dokument	1-40

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angabe der Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP 00/01906

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 3919644	A	20-12-1990	KEINE		
DE 2541685	A	24-03-1977	AT	355716 B	25-03-1980
			AT	673176 A	15-08-1979
			BE	846331 A	17-01-1977
			DK	421176 A	19-03-1977
			FR	2324312 A	15-04-1977
			NL	7610260 A	22-03-1977
EP 242135	A	21-10-1987	CA	1301682 A	26-05-1992
			DE	3763513 D	09-08-1990
			US	5288632 A	22-02-1994

Formblatt PCT/IS-4210 (Anleitung Patentfamilie) (Juli 1992)